

Title	Baculovirus GP64-mediated entry into mammalian cells
Author(s)	片岡, 周子
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/59005">https://hdl.handle.net/11094/59005</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#">ご参照</a> ください。

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	片岡 周 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (医学)
学 位 記 番 号	第 2 5 0 7 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 24 年 3 月 22 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科予防環境医学専攻
学 位 論 文 名	Baculovirus GP64-mediated entry into mammalian cells (バキュロウイルスエンベロープ蛋白質 GP64 を介した哺乳動物細胞への侵入機構の解明)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 松浦 善治 (副査) 教 授 生田 和良 教 授 塩田 達雄

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

バキュロウイルス (AcMNPV) は目的蛋白質を昆虫細胞で大量に産生可能な遺伝子発現ベクターとして広く用いられているが、哺乳動物細胞にも効率よく侵入し、複製すること無く外来遺伝子を導入できることから、遺伝子導入ベクターとしても注目されている。AcMNPV の感染にはエンベロープ蛋白質である GP64 が重要な役割を演じていが、哺乳動物細胞への侵入機構については相反する成績が報告されており、その詳細は未だ明らかにされていない。本研究では組換えバキュロウイルスおよびバキュロウイルスの GP64 を搭載したシュードタイプウイルスを用いて、GP64 を介したウイルスの哺乳動物細胞への侵入機構を解析した。

〔 方 法 ならびに 成 績 〕

水疱性口内炎ウイルス (VSV) のエンベロープ蛋白質 (G) 遺伝子をルシフェラーゼ遺伝子に置換した組換え VSV に、一過性に AcMNPV、VSV、そして Murine leukemia virus (MLV) のエンベロープ蛋白質を粒子表面に搭載したシュードタイプウイルス、NPVpv、VSVpv、MLVpv を作製した。また、CAG プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を搭載した組換えバキュロウイルス (AcCALuc) を使用した。

まず、GP64 を介したウイルスの細胞への吸着や侵入過程に及ぼすコレステロールの役割を検討するため、コレステロール除去剤である methyl- $\beta$ -cyclodextrin やコレステロール合成阻害剤であるロバスタチンで細胞を処理した。これらの薬剤処理によりウイルスの細胞膜表面への吸着に変化はなかったが、細胞内への侵入は抑制された。次に、GP64 を介した細胞内への侵入過程を解析するために、侵入過程の各ステップに対する阻害剤やドミナントネガティブ変異体の影響を検討した。ダイナミン活性阻害剤である dynasore やダイナミンのドミナントネガティブ変異体 (K44A) を用いたところ、dynasore の濃度依存的に、また、K44A の発現により GP64 を介したウイルスの細胞内侵入が阻害された。さらに、クラスリン依存的なエンドサイトーシスの阻害剤である chlorpromazine やクラスリンのアダプター蛋白質である Eps15 のドミナントネガティブ変異体 ( $\Delta$ 95-295) を用いたところ、chlorpromazine の濃度依存的に、また、 $\Delta$ 95-295 の発現により GP64 を介したウイルスの細胞内侵入が抑制された。一方、カベオリンのドミナントネガ

ティブ変異体の発現や、そのノックダウン細胞では細胞侵入には影響は認められなかった。さらに、マクロビノサイトーシスの阻害剤である EIPA、および、マクロビノソーム形成に関与する Rab34 のドミナントネガティブ変異体 (T66N) を用いたところ、EIPA の濃度依存的に、また、T66N の発現により GP64 を介したウイルスの細胞内侵入が抑制された。バキュロウイルスの侵入を生きた細胞で解析するため、GP64 にテトラシステインタグを挿入して蛍光標識したウイルスを調整した。標識されたバキュロウイルスは、マクロビノサイトーシスにより細胞内へ取り込まれるデキストランと共に細胞に侵入して行く様子が観察された。以上の成績から、GP64 を介したウイルスの細胞内への侵入には、コレステロール、ダイナミンやクラスリン依存的なエンドサイトーシス、そしてマクロビノサイトーシスが関与することが明らかになった。

〔 総 括 〕

バキュロウイルスのエンベロープ蛋白質 GP64 を介したウイルスの細胞内への侵入機構を、阻害剤やドミナントネガティブ変異体を用いて解析した。バキュロウイルスおよび GP64 を搭載したシュードタイプウイルスは、細胞表面のコレステロール、ダイナミンおよびクラスリン依存的なエンドサイトーシス、そしてマクロビノサイトーシを介して細胞内へ侵入するが、カベオラ依存的なエンドサイトーシスは利用しないことが明らかとなった。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

バキュロウイルス (AcMNPV) は哺乳動物細胞にも効率よく感染することから、近年では哺乳動物細胞への遺伝子導入ベクターとしても注目されている。AcMNPV の細胞への侵入にはエンベロープ蛋白質である GP64 が重要な役割を演じているが、哺乳動物細胞への侵入機構に関してはこれまでにいくつかの相反する成績が報告されており、未だその詳細は明らかにされていない。本研究では、AcMNPV 粒子と AcMNPV の GP64 を被ったシュードタイプウイルスを用いて、GP64 を介した哺乳動物細胞へのウイルス侵入機構の解明を試みた。Methyl- $\beta$ -cyclodextrin を用いて細胞膜からコレステロールを除去すると、濃度依存的に GP64 を介した細胞内への侵入は抑制されたが、細胞表面への吸着には影響を示さなかった。また、ウイルスの細胞侵入の各ステップに対するドミナントネガティブ変異体や阻害剤を用いた解析を行った。これらの成績から、GP64 を介したウイルスの細胞内侵入は、細胞膜のコレステロールが重要であり、カベオラ非依存的、ダイナミン及びクラスリンそしてマクロビノサイトーシス依存的に細胞内に侵入している事が明らかされた。

本研究はバキュロウイルスの細胞侵入機構を詳細な解析により明らかにした論文である。  
以上より本論文は博士 (医学) の学位授与に値するものと認められる。